



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Efecto de las mutaciones en la posición 458 del ARNr
23S de *Escherichia coli***

**Efecto das mutacións na posición 458 do ARNr 23S de
*Escherichia coli***

**Effect of mutations at position 458 of rRNA 23S of
*Escherichia coli***

Icía Lista Pombo

Curso: 2019- 2020.

Convocatoria: Xullo

Director: Antón Vila Sanjurjo



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

El Dr. Antón Vila Sanjurjo, con DNI 32773313 S,

CERTIFICA QUE

El presente Trabajo de Fin de Grado titulado 'Efecto de las mutaciones en la posición 458 del ARNr 23S de *Escherichia coli*' presentado por Icíá Lista Pombo, ha sido realizado bajo su dirección y autoriza su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente el día 30 de julio de 2020.

A Coruña, 22 de julio de 2020.

VILA SANJURJO
ANTONIO -
32773313S

Digitally signed by VILA SANJURJO
ANTONIO - 32773313S

DN: c=ES, serialNumber=IDCES-32773313S,
givenName=ANTONIO, sn=VILA SANJURJO,
cn=VILA SANJURJO ANTONIO - 32773313S
Date: 2020.07.23 10:19:45 +02'00'

Fdo.: Antón Vila Sanjurjo

Modificación del Trabajo de Fin de Grado derivada del decreto del estado de alarma de marzo de 2020

El presente Trabajo de Fin de Grado pretendía ser una investigación sobre las consecuencias derivadas de la mutagénesis de sitio-dirigida en la posición 458 del ARN ribosómico 23S del organismo modelo *Escherichia coli*, pero debido a la situación sobrevenida por el decreto del Estado de Alarma derivado de la pandemia de la COVID-19 (establecido desde el 14 de Marzo de 2020 hasta el 21 de Junio del mismo año) todo el trabajo de laboratorio se vio interrumpido. Por este motivo, la memoria que se presenta explicará en qué consiste la propuesta de investigación en el laboratorio para analizar las consecuencias de las mutaciones y los resultados obtenidos hasta el decreto de dicho Estado de Alarma, así como los que pretendían alcanzarse y las posibles conclusiones si se hubiese llevado a cabo el proyecto de manera íntegra.

RESUMEN

La posición 1172G del ARNr 16S mitocondrial humano forma parte de una estructura de tipo lazo E muy conservada en la evolución, y mediante el análisis inferencial heterólogo se observó que su mutación conlleva un descenso del 60% de los niveles de ARNr 16S (Haumann et al., 2020). Como no existen datos de mutagénesis directa en células humanas, recrear las mutaciones de esta posición en un organismo heterólogo, como *Escherichia coli*, podría resultar interesante a la hora de estudiar el mecanismo escondido tras su poder disruptivo.

En esta memoria se presenta la propuesta de investigación sobre los efectos de la mutagénesis directa en la posición 458 del ARNr 23S de *Escherichia coli* y se detallan los resultados que esperan encontrarse según la bibliografía publicada hasta el momento, entre los que cabría esperar que todas las mutaciones en la posición 458 diesen lugar a fenotipos letales o deletéreos.

RESUMO

A posición 1172G do ARNr 16S mitocondrial humano forma parte dunha estrutura de tipo lazo E moi conservada na evolución, e mediante a análise inferencial heteróloga observouse que a súa mutación trae consigo un descenso do 60% dos niveis de ARNr 16S (Haumann et al., 2020). Como non existen datos de mutaxénese directa en células humanas, recrear as mutacións desta posición nun organismo heterólogo, como *Escherichia coli*, podería resultar interesante á hora de estudar o mecanismo escondido tras o seu poder disruptivo.

Nesta memoria preséntase a proposta de investigación sobre os efectos da mutaxénese directa na posición 458 do ARNr 23S de *Escherichia coli* e detállanse os resultados que esperan atoparse segundo a bibliografía publicada ata o momento, entre os que cabería agardar que todas as mutacións na posición 458 desen lugar a fenotipos letais ou deletéreos.

ABSTRACT

The 1172G position of 16S rRNA of human mithoribosome is part of a highly conserved E-loop-like structure very conserved in evolution, and by heterologous inferential analysis it was observed that its mutation leads to a 60% decrease in 16S rRNA levels (Haumann et al., 2020). Since there is no data on direct mutagenesis in human cells, recreating mutations of this position in a heterologous organism, such as *Escherichia coli*, could be interesting to study the hidden mechanism behind its disruptive power.

This report presents the research proposal on the effects of direct mutagenesis at position 458 of the *Escherichia coli* 23S rRNA and details the results that are expected to be found according to the literature published so far, among which it would be expected that all mutations at position 458 give rise to lethal or deleterious phenotypes.

PALABRAS CLAVE

Escherichia coli, ribosoma bacteriano, ARN ribosómico, mutagénesis directa, OE-PCR.

ÍNDICE

Introducción	1
1. <i>Escherichia coli</i> como organismo modelo	1
1.1 El ribosoma bacteriano	1
1.2 La importancia del ARNr en la estructuración y funcionalidad del ribosoma	2
2. La mutagénesis de sitio-dirigida por medio de OE-PCR	3
3. Clonación de fragmentos de interés y transformación de células hospedadoras	4
3.1 Los vectores de clonación plasmídicos	4
3.1.1 Las endonucleasas de restricción y la ADN ligasa	5
3.2 Transformación de células de la especie <i>Escherichia coli</i>	5
Estado actual de la investigación propuesta	6
1. El motivo en lazo E en el ARNr 23S de <i>Escherichia coli</i>	6
Hipótesis que plantea el proyecto	8
Objetivos del proyecto	8
Metodología	8
1. Microorganismo huésped y vector de clonación	8
2. Medios de cultivo y antibióticos	9
3. Extracción del ADN plasmídico	9
4. Mutagénesis de sitio-dirigida	10
4.1 Cebadores empleados	10
4.2 Protocolo de la OE-PCR	11
4.2.1 OE-PCR: inducción de la mutación	12
4.2.2 OE-PCR: extensión del fragmento recombinante	12
4.3 Amplificación del fragmento recombinante	13
5. Purificación de los productos de PCR	13
6. Electroforesis en gel de agarosa	13
7. Purificación de los fragmentos de interés contenidos en el gel de agarosa	14
8. Inserción del ADN recombinante en el vector de clonación	14
8.1 Endonucleasas de restricción empleadas	14
9. Transformación de la cepa hospedadora y selección de colonias transformadas	15
10. Secuenciación del plásmido contenido en las células transformadas	15
11. Análisis de crecimiento de las cepas mutantes	16
Plan de trabajo	16
Resultados	17
Discusión	19
Conclusiones	19
Bibliografía	20

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosómico

ARNt: ARN transferente o de transferencia

Amp.: Ampicilina

E. coli: *Escherichia coli*

ETH: Elementos de Transmisión Horizontal

F (cebador): cebador *Forward*, hibridación 5'-3' con la hebra de ADN molde

HIA: Análisis Inferencial Heterólogo (*Heterologous Inferential Analysis*)

HPSF (cebadores): Alta Pureza Libres de Sales (*High Purity Salt Free*)

H. sapiens: *Homo Sapiens*

LSU: Subunidad grande del ribosoma (*Large Subunit*)

mt.: mitocondrial

OE-PCR: *Overlap Extension* PCR

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

R (cebador): cebador *Reverse*, hibridación 3'-5' con la hebra de ADN molde

S: coeficiente de sedimentación, coeficiente de Svedverg

SD (secuencia): Shine Dalgarno

SSU: Subunidad pequeña del ribosoma (*Small Subunit*)

WC: Watson-Crick

1782G: posición 1782 (Guanina) del ARNr mt. 16S de *H. sapiens*

1782G>A: mutación G>A (Guanina>Adenina) en la posición 1782 del ARNr mt. de *H. sapiens*

458G: posición 458 (Guanina) del ARNr 23S de *E. coli*

458G>A: mutación G>A (Guanina>Adenina) en la posición 458 del ARNr 23S de *E. coli*

124A: posición 124 (Adenina) del ARNr 23S de *E. coli*

INTRODUCCIÓN

El proyecto propuesto pretende analizar las consecuencias derivadas de la mutagénesis inducida en la posición 458 del ARNr 23S de *E. coli* (mt. 1782G en *H. sapiens*). Para facilitar la contextualización de dicho proyecto, seguidamente se hablará del organismo empleado y las características principales de su ribosoma y el ARNr, y se introducirán las técnicas principales empleadas en la investigación.

1. *Escherichia coli* como organismo modelo

E. coli es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Es un microorganismo anaerobio facultativo, encontrado habitualmente en el tracto intestinal de los animales endotermos.

Esta bacteria es el organismo modelo por excelencia empleado en las investigaciones de genética molecular, principalmente por su simplicidad y facilidad de propagación y aislamiento en el laboratorio (presenta un rápido crecimiento y simples requerimientos nutricionales) y porque existen cepas con resistencias a diferentes antibióticos, facilitando la selección de fenotipos de interés. Además, su genoma está compuesto por una única molécula de ADN circular muy enrollado y condensado en el nucleóide, es de pequeño tamaño (aproximadamente 4.6 millones de pares de bases, que codifican alrededor de 4300 genes) y fue completamente secuenciado a finales de los años 90 del siglo pasado por Blattner y colaboradores (1997), lo que proporciona importantes ventajas para su análisis genético (Cooper y Hausman, 2014; Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009).

1.1 El ribosoma bacteriano

Los ribosomas son el lugar en el que se lleva a cabo la síntesis proteica y la cantidad en la que están presentes en el citoplasma celular está directamente relacionada con la actividad metabólica y la tasa de crecimiento del organismo: por ejemplo, en el caso concreto de *E. coli*, cada célula presenta entre 20000 y 30000 ribosomas en su citoplasma (Cooper y Hausman, 2014; Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009).

Cada ribosoma es una estructura dinámica compuesta por dos subunidades que se asocian y disocian de forma alterna para la síntesis proteica, siendo cada una un complejo ribonucleoproteico formado por ARNr y proteínas ribosómicas: los ARNrs de cada subunidad componen el núcleo estructural y funcional, mientras que las proteínas establecen los puentes de unión entre subunidades y con los ARNt. Se designan en función de su coeficiente de sedimentación: así, el ribosoma bacteriano tiene un coeficiente de sedimentación total de 70S, y está formado por una subunidad grande 50S y una pequeña 30S (Cooper y Hausman, 2014):

- La subunidad grande, o LSU, contiene el ARNr 23S y 5S, y 31 proteínas.

El componente principal de la subunidad, el ARNr 23S, se pliega formando 6 dominios estructurales secundarios que constituyen más de 130 hélices de ARNr (dominios I-VI), los cuales están profundamente entrelazados unos con otros y conforman la mayor superficie de contacto entre las subunidades. Por su parte, el ARNr 5S forma un séptimo dominio estructural (constituyendo una estructura terciaria). Las proteínas de esta subunidad son, mayoritariamente, periféricas (Yusupov, 2001).

- La subunidad pequeña, o SSU, contiene el ARNr 16S y 21 proteínas.

El componente principal de esta subunidad, el ARNr 16S, se pliega formando, en este caso, 4 dominios (dominios 5', central, 3' principal y 3' secundario), los cuales son estructuralmente autónomos y pueden moverse independientemente durante la síntesis proteica. En este caso, es el propio ARNr 16S el que forma la mayor superficie de contacto entre subunidades, y las proteínas aparecen también, mayoritariamente, en la periferia de la subunidad (Yusupov, 2001).

1.2 La importancia del ARNr en la estructuración y funcionalidad del ribosoma

Los ARNrs conforman estructuras secundarias características por complementariedad de bases WC. Además, los residuos de los ARNrs se hallan implicados en una gran cantidad de estructuras terciarias y cuaternarias, asociados a las proteínas ribosómicas, dando lugar a un plegamiento conformacional superior que constituye la estructura tridimensional del ribosoma. Inicialmente se consideraba que la importancia de los ARNrs era exclusivamente estructural, pero una vez descubierta la función catalítica de otros tipos de ARN, comenzó a estudiarse la posibilidad de que los ARNrs también tuviesen importancia a nivel funcional:

En los años 90 se demostró que la LSU era la principal implicada en la formación del enlace peptídico en las proteínas nacientes, y que esta reacción peptidiltransferasa era catalizada por el ARNr, al extraer aproximadamente el 90% de las proteínas ribosómicas (Noller, H., Hoffarth, V. y Zimniak, L., 1992). Por otro lado, en el año 2000, al analizar la estructura de alta resolución de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano se comprobó que en el sitio en el que tenía lugar la reacción peptidiltransferasa las proteínas ribosómicas estaban prácticamente ausentes (Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. y Steitz, T., 2000). Con estos y otros trabajos, se llegó a la conclusión de que la subunidad grande del ribosoma actúa como una ribozima, y que es el ARN el que cataliza la principal reacción en la síntesis de las proteínas (Cooper y Hausman, 2014).

Durante proceso de síntesis proteica, es el ARNr el que favorece la asociación de las subunidades del ribosoma y el posicionamiento de los ARNt en los sitios A y P. En procariotas, el ARNr 16S determina la iniciación de la síntesis proteica por el apareamiento de bases con la secuencia SD del ARNm, ayuda a mantener al ARNm posicionado a cada lado de los sitios A y P junto con varias proteínas ribosómicas y al él se unen en el ribosoma los ARNt cargados por interacciones de su estructura tallo-bucle. Por su parte, el ARNr 23S está involucrado en el apareamiento con el extremo aceptor de los ARNt, cataliza la formación real de los enlaces peptídicos (la reacción peptidiltransferasa) e interviene en la translocación del ribosoma, ya que los factores de traducción interactúan específicamente con él (Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009).

En conclusión, los ARNr están ampliamente involucrados tanto en la estructuración del ribosoma como en su actividad catalítica durante el proceso de síntesis proteica y, por tanto, su alteración (espontánea o inducida) puede traer consecuencias tanto a nivel estructural (en la asociación de las subunidades) como funcional (en el proceso de traducción).

2. La mutagénesis de sitio-dirigida por medio de OE-PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, o PCR, fue ideada por Kary B. Mullis en 1983: con ella, una molécula de ADN puede amplificarse hasta 100 billones de veces en unas pocas horas partiendo de una muestra de material genético (la cual puede ser pura o formar parte de una compleja mezcla biológica, y estar incluso a muy baja concentración), ya que el número de copias de la molécula se incrementa exponencialmente en cada ciclo de PCR (Mullis, 1990).

En la investigación que se propone se emplea una variante de la PCR convencional para ejecutar la mutagénesis de sitio-dirigida por PCR, la variante *Overlap Extension PCR* (OE-PCR), mediante la cual se puede inducir una mutación en una posición deseada de forma directa, eficiente y confiable (Bryksin y Matsumura, 2010). Este método se lleva a cabo mediante la realización de dos PCR consecutivas siguiendo, en gran medida, el protocolo convencional de PCR, aunque con dos ligeros cambios en lo relacionado con los cebadores empleados y la temperatura de la fase de hibridación o *annealing* en los ciclos del termociclador (Tabla 1):

- Por una parte, además de los cebadores sintéticos que flanquean el fragmento de interés ('F' y 'R') empleados en una PCR convencional, se necesita otro par de cebadores que hibride en la posición que desea mutarse y que porten la mutación que desea inducirse. Además, en la primera PCR se emplean los cebadores sintéticos para amplificar el segmento de interés e inducir la mutación, pero los cebadores que se emplean en la segunda PCR son los fragmentos obtenidos en la primera actuando, así, como hebra molde y cebadores al mismo tiempo.
- En segundo lugar, la temperatura fijada para la fase de hibridación en la segunda PCR debe ser entre 5 y 10°C inferior a la temperatura de desnaturalización o *melting* calculada para los cebadores sintéticos, para que la extensión del fragmento recombinante sea eficiente.

A la hora de diseñar la estrategia de inducción de la mutación y el protocolo de las PCR es importante tener en cuenta que el número de copias recombinantes aumenta de forma geométrica en los primeros 15 ciclos de PCR, con un pico de producción a los 17-18 ciclos, para luego empezar a decrecer alrededor del 30% debido a la elevada concentración de copias de ADN de alto peso molecular no recombinante (Bryksin y Matsumura, 2010).

Tabla 1. Diferencias entre la PCR convencional y la OE-PCR.

	PCR convencional	OE-PCR
Cebadores	Se emplean siempre dos cebadores que flanquean la secuencia que desea amplificarse ('F' y 'R').	Además de los cebadores que flanquean la secuencia que desea amplificarse ('F' y 'R'), se emplea otro par que hibrida en la posición en la que desea insertarse la mutación, y éstos son portadores de la mutación que desea inducirse.
Temperatura de la fase de hibridación	Se emplea la temperatura media de <i>melting</i> de la pareja de cebadores empleados.	En la segunda PCR, la temperatura de hibridación debe ser entre 5 y 10°C inferior a la calculada para los cebadores sintéticos.

3. Clonación de fragmentos de interés y transformación de células hospedadoras

La investigación propuesta pretende transformar células de *E. coli* al introducir la secuencia mutada del ARNr 23S empleando un vector de clonación plasmídico. A continuación, se explicará brevemente en qué consiste tanto el proceso de clonación, es decir, la inserción del ADN recombinante en el vector de clonación plasmídico, como el método que se lleva a cabo más comúnmente a la hora de transformar bacterias de la especie *E. coli* con plásmidos.

3.1 Los vectores de clonación plasmídicos

Los plásmidos son elementos de transmisión horizontal (ETH) que pueden transmitirse entre organismos de la misma o de distinta especie, algo que nos interesa para asegurar que el vector de clonación se asiente en la mayor cantidad de células posible durante el proceso de transformación. Se definen como moléculas de ADN extracromosómico que aparecen de forma natural en muchas especies de bacterias y que pueden llegar a suponer entre el 1% y el 10% de su genoma; son capaces de replicarse de manera autónoma y, aunque generalmente no son esenciales para la célula, suelen contener genes que le confieren propiedades que le son favorables, tales como resistencia a antibióticos, mayor capacidad patogénica o actividades metabólicas complementarias (Cooper y Hausman, 2014; Madigan, Martinko, Dunlap y Clark, 2009; Lodish, 2016).

Los vectores de clonación plasmídicos suelen presentar una estructura general conformada por tres regiones (Figura 1): una región con las secuencias necesarias para cumplir las funciones esenciales (la replicación, el mantenimiento del plásmido y su transferencia), una región que presenta los genes de resistencia a antibióticos, para la selección de las bacterias transformadas, y una última región llamada *polylinker*, con numerosas dianas de endonucleasas de restricción, dentro de la cual se inserta el ADN exógeno (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez y Vila, 2005).

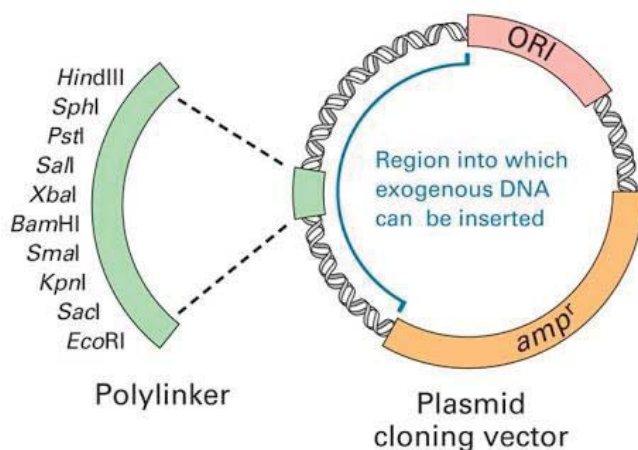


Figura 1. Estructura general de un vector de clonación plasmídico modelo. Consiste en los siguientes elementos: la región ORI, que contiene el origen de replicación, un gen de resistencia a Ampicilina (Amp^r), y la región *polylinker* o sitio de clonación múltiple, con las secuencias diana de numerosas endonucleasas de restricción. Fuente: Lodish, 2016.

3.1.1 Las endonucleasas de restricción y la ADN ligasa

Para introducir el ADN recombinante en el vector de clonación se emplean enzimas de tipo endonucleasas de restricción, para digerir ambos y obtener extremos complementarios, y la ADN ligasa, para unir los extremos complementarios obtenidos y reconstruir el plásmido con el inserto (Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009).

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen una secuencia diana específica, de 4 a 8 pares de bases de longitud, y que cortan la doble hebra azúcar-fosfato en ese punto al hidrolizar el enlace fosfodiéster entre nucleótidos, lo que hace posible obtener pequeños fragmentos de ADN (Mullis, 1990). Se encuentran de forma natural en una gran cantidad de organismos procariotas, ya que son necesarias en los procesos de eliminación de ADN exógeno: dichos organismos reconocen secuencias que no son propias de su genoma y cortan el ADN para eliminar el fragmento obtenido luego del corte (Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009).

Por su parte, la ADN ligasa es una enzima que cataliza la síntesis de enlaces fosfodiéster entre el grupo fosfato del extremo 5' y el grupo hidroxilo del extremo 3' adyacentes en la molécula de ADN dúplex cortada. Es una enzima que aparece también de forma natural en todas las células, siendo esencial para la replicación y reparación del ADN, y que ha demostrado ser extremadamente útil para la construcción de moléculas de ADN recombinante (Lehman, 1974).

3.2 Transformación de células de la especie *Escherichia coli*

Uno de los métodos más comunes para llevar a cabo la transformación de células de la especie *E. coli* es mediante choque térmico: se combinan las que van a ser las células hospedadoras con el ADN plasmídico recombinante en un medio selectivo en presencia de elevadas concentraciones de Ca^{+2} (50 mM) a 0°C y, posteriormente, se somete la mezcla a un breve pulso de temperatura entre 37 y 42°C, unas condiciones que inducirán el estado de competencia de la célula para que ésta sea capaz de introducir el fragmento de ADN exógeno (Hanahan, 1983).

ESTADO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA

Nuestro grupo ha evaluado el papel patogénico de la mutación MT-RNR2 (mt. 1782G>A) en células humanas de la línea L428 mediante análisis inferencial heterólogo (Haumann et al., 2020). El HIA se fundamenta en la identificación residuos funcional y estructuralmente equivalentes de diferentes orígenes filogenéticos gracias a la universalidad del ribosoma y a la conservación del plegamiento de los ARNr, y se creó para evaluar las posibles consecuencias patogénicas de las mutaciones encontradas en los genes codificantes de los ARNr mitocondriales (Elson, Smith y Vila-Sanjurjo, 2015; Vila-Sanjurjo, Smith y Elson, 2020).

La posición 1782G aparece en una región altamente conservada y estructurada de la LSU del ribosoma mitocondrial humano, un motivo en lazo E que ocupa las hélices h3, h4 y h23, uniendo diferentes áreas y recubriendo parte del túnel de salida por el que se excretan las proteínas nacientes, también muy conservado en la evolución (Leontis y Westhof, 1998). Mediante análisis bioquímico se observó, como resultado de la mutación 1782G>A, un descenso del 60% de los niveles de ARNr 16S mt. y un aparente descenso de la traducción mitocondrial, lo que sugiere una afectación en la composición de la maquinaria de traducción en la mitocondria y a partir de lo que puede suponerse que presenta un papel patogénico (Haumann et al., 2020).

Por este motivo, y aprovechando la conservación del residuo y toda la estructura que lo rodea, el hecho de recrear la mutación mt. 1782G>A en un organismo heterólogo, como *E. coli*, podría ser una opción muy útil a la hora de conocer el mecanismo causante de su poder disruptivo.

1. El motivo en lazo E en el ARNr 23S de *E. coli*

Los motivos terciarios de ARN (bucles internos o de unión, u horquillas) son conjuntos de pares de bases que no siguen la complementariedad de WC y forman pliegues distintivos en los esqueletos fosfodiéster de las cadenas de ARN, provocando que diferentes segmentos de una misma molécula de ARN, o incluso moléculas independientes, interactúen entre sí. Dichos pliegues pueden estabilizarse por medio de puentes de hidrógeno entre el azúcar y un fosfato o entre el esqueleto de fosfatos y una base, o mediante contactos entre pares de bases diferentes a los WC. Estos motivos pueden constituir lugares de unión para proteínas específicas o ligandos (Leontis y Westhof, 2003).

La posición que pretendíamos analizar mediante mutagénesis de sitio-dirigida, la 458G en la hélice 23 del ARNr 23S – dominio I – de *E. coli*, está involucrada en la estructura de un lazo E, muy conservado en la evolución, de los cuales el ejemplo más conocido es el lazo sarcina-ricina que es modificado por las proteínas citotóxicas α -sarcina y ricina y que está directamente relacionado en la unión de los factores de elongación al ribosoma (Leontis y Westhof, 1998). Mutaciones en el residuo equivalente a 458G en el lazo sarcina-ricina dieron lugar a fenotipos letales, con la excepción del cambio G a A, que dio lugar a un descenso del 50% de la síntesis proteica (Macbeth y Wool, 1999).

La estructura del motivo de interés en bucle E de la hélice h23 de *E. coli* (Figura 2) es la siguiente: el lazo está cubierto por un tetrabucle de GNRA (apareamientos no WC de bases G:A) que aparece separado del motivo propiamente dicho por un tándem de pares de bases G:C y le confiere al motivo una elevada estabilidad estructural, constituyendo el núcleo de plegamiento del ARN (Heus y Pardi, 1991). Dentro del bucle, la posición

458G interactúa con el residuo 124 (entre otros) mediante un enlace de hidrógeno conservado entre el nitrógeno 1 de la posición 458G y el oxígeno del fosfato de la posición 124A, y aunque el enlace no tiene por qué romperse con la mutación del residuo 458G>A, el hecho de que esté conservado casi universalmente respalda la idea de que la mutación podría ser deletérea (Haumann et al., 2020).

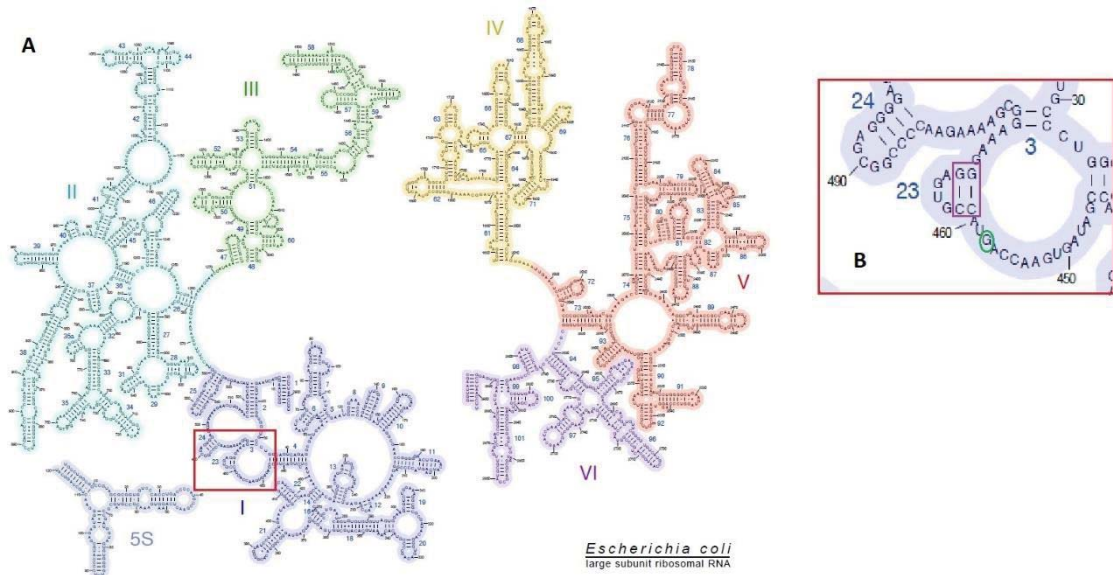


Figura 2. A, Estructura secundaria de la subunidad grande 50S de *E. coli*; **B**, Zoom del motivo en bucle E de la hélice h23 (dominio I), en el que aparecen la posición 458G (círculo verde) y el tándem de pares de bases G:C (rectángulo morado) que separan el tetrabucle de GNRA del motivo real. Editado a partir de las estructuras (sin publicar) obtenidas por Vila-Sanjurjo, 2001.

Que este tipo de motivos en lazo E se haya conservado en tal medida en la evolución (Figura 3) y que aparezca en sitios involucrados en la unión de proteínas primarias y secuencias de ARN que definen la estructura de distintos dominios del ARNr 16S y 23S, sugiere que evolucionaron dentro de bucles internos y de unión debido a su habilidad para participar en la organización y estructuración de múltiples uniones ARN-ARN y ARN-proteína (Leontis y Westhof, 1998).

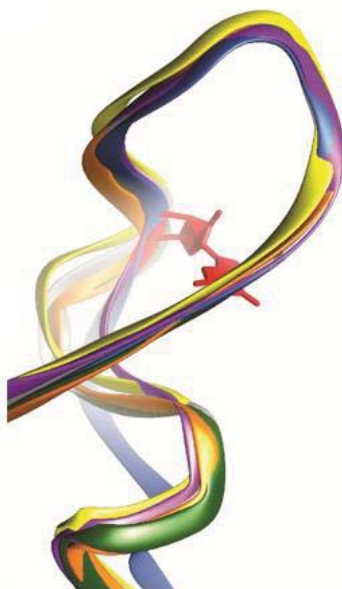


Figura 3. El motivo tipo lazo o bucle E está muy conservado en la evolución. Se muestra la superposición de los motivos de bucle E de la hélice h23 de todos los dominios filogenéticos, apareciendo la posición 458G como referencia (en rojo): LSU del ribosoma mitocondrial (en púrpura) y citoplasmático (en verde) de mamíferos, LSU del ribosoma bacteriano (en gris), LSU del ribosoma de Arqueas (en naranja), LSU del ribosoma de levaduras (en azul) y LSU de ribosoma de cloroplasto (en amarillo). Editado de: Haumann et al., 2020. (ID en RCSB: 3J9M, 3J7R, 2J01, 1VW3 y 3MMI, respectivamente).

HIPÓTESIS QUE PLANTEA EL PROYECTO

Debido a la universalidad del motivo en bucle E descrito, y sabiendo que según análisis mutacionales realizados anteriormente para el lazo sarcina-ricina se obtienen fenotipos deletéreos, se plantea que las mutaciones en la posición 458 podrían afectar a la estructuración de la molécula de ARNr 23S y/o al ensamblaje del ribosoma y acarrear consecuencias deletéreas, tales como alteraciones en el crecimiento de las células debidas a problemas en el proceso de traducción de proteínas.

OBJETIVOS DEL PROYECTO

La presente memoria pretende cumplir 4 objetivos principales:

1. Respalda la necesidad de la investigación propuesta respecto a la bibliografía publicada hasta el momento sobre el tema.
2. Explicar el procedimiento que debería llevarse a cabo tanto en el ámbito del trabajo en el laboratorio como en el ámbito del trabajo con herramientas bioinformáticas.
3. Mostrar la planificación del trabajo que pretendía realizarse hasta el día 13 de marzo de 2020, cuando se decretó el Estado de Alarma debido a la pandemia de la COVID-19, así como los procesos que sí pudieron concluirse hasta dicha fecha.
4. Explicar los resultados obtenidos hasta la fecha en la que se decretó el Estado de Alarma y los que esperaban obtenerse una vez finalizado el proyecto.

METODOLOGÍA

A continuación, se describen los métodos y sus materiales por orden de realización.

1. Microorganismo huésped y del vector de clonación

Como cepa hospedadora se emplea la cepa de *E. coli* AVS69009 (delta7). Es importante tener en cuenta que el trabajo con esta cepa debe de ser rápido, pues no soporta los cambios bruscos de temperatura y no puede almacenarse en frío una vez sembrada (Vila-Sanjurjo, Squires y Dahlberg, 1999). Antes de transformar dicha cepa para analizar los efectos de las mutaciones inducidas, se transforma la MDA6646, también de *E. coli*, la cual presenta el alelo *pcnB* y permite el mantenimiento de bajos niveles de plásmidos portadores de mutaciones altamente perjudiciales para la célula (Vila-Sanjurjo, y Dahlberg, 2001), necesario para secuenciar posteriormente el ADN plasmídico y asegurar que se han inducido las mutaciones deseadas.

Como vector de clonación se emplea el plásmido pKK-3535: este es un plásmido multicopia que contiene la secuencia del operón *rrnB* de *E. coli* y que ha sido completamente secuenciado por el Dr. H. Noller (Zweib y Dahlberg, 1984). El uso de este vector de clonación plasmídico se debe a que en su secuencia se incluye el gen que codifica para el ARNr 23S de *E. coli*, donde se encuentra la posición que desea mutarse (la 458G). Es importante tener en cuenta, también, que el plásmido porta un gen de resistencia a la Ampicilina, antibiótico necesario para seleccionar finalmente las bacterias que sí han sido transformadas en un medio de cultivo. En lugar de adquirir el

plásmido en una casa comercial, el laboratorio del grupo de investigación GIBE de la Universidade da Coruña proporciona la cepa TG-1 de *E. coli*, la cual ha sido transformada previamente con dicho plásmido, siendo necesario extraerlo.

Antes de empezar con la investigación, es interesante comprobar la pureza de la cepa TG-1 de *E. coli* empleada para la extracción del ADN plasmídico, lo que puede hacerse sembrando en un medio de cultivo selectivo (medio sólido LB con Ampicilina); además, con este paso se obtienen colonias aisladas que pueden emplearse posteriormente para la extracción.

2. Medios de cultivo y antibióticos

Para el cultivo de *E. coli* se utiliza medio de cultivo LB:

- Para los cultivos sólidos:

LB Broth with Agar (Lennox) de Sigma-Aldrich; con 10 g/L de Agar, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl. Se prepara a una concentración de 35 g/L.

- Para los cultivos líquidos:

LB Broth (Miller) de Sigma-Aldrich; con 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura. Se prepara a una concentración de 25 g/L.

En ambos casos se añade finalmente Amp. 200 mg/mL para conseguir un medio selectivo y poder asegurar que sólo crezcan las células que han incorporado el plásmido el cual, como ya se ha explicado, presenta un gen de resistencia a dicho antibiótico.

3. Extracción del ADN plasmídico

Para la extracción del plásmido se emplea el *kit* NucleoSpin Plasmid EasyPure Minikit, de Macherey-Nagel. Este *kit*, además de extraer el ADN plasmídico, elimina la contaminación de la muestra (sales, metabolitos, nucleasas y componentes celulares macromoleculares).

El funcionamiento del *kit* empleado está basado en el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1983): es uno de los métodos más empleados para aislar plásmidos de bacterias Gram negativas, como lo son las de la familia *Enterobacteriaceae*, y se basa en la tolerancia de los diferentes tipos de ADN a los niveles elevados de pH (Coll, Coque, Domínguez, Vázquez y Vila, 2005).

Después de cultivar y aislar las células de *E. coli* TG-1 en medio sólido LB (se permite el crecimiento entre 12 y 16 horas a 37°C), se pasan a un medio líquido LB (permitir crecimiento nuevamente durante 12-16 horas y a 37°C, y con agitación constante entre 200 y 250 rpm). En ambos casos se añade antibiótico al medio (Amp. 200 mg/mL) para mantener la pureza del cultivo y evitar que las células pierdan el plásmido que les confiere resistencia durante la división celular. Luego, se procede a la concentración del material celular por centrifugación para obtener un *pellet* y se resuspende dicho *pellet* en una columna o tubo de microcentrífuga con las soluciones que incluye el *kit* de extracción para la separación de los dos tipos de ADN.

4. Mutagénesis de sitio-dirigida

4.1 Cebadores empleados

A la hora de diseñar los cebadores necesarios para inducir las mutaciones y amplificar el fragmento de interés se emplea el *software* bioinformático gratuito de análisis genómico Unipro UGENE (<http://ugene.net>): en él puede visualizarse la secuencia completa del plásmido pKK-3535, la cual hemos descargado de http://genome-www.stanford.edu/vectordb/vector_descrip/COMPLETE/PKK3535.SEQ.html (Figura 4).

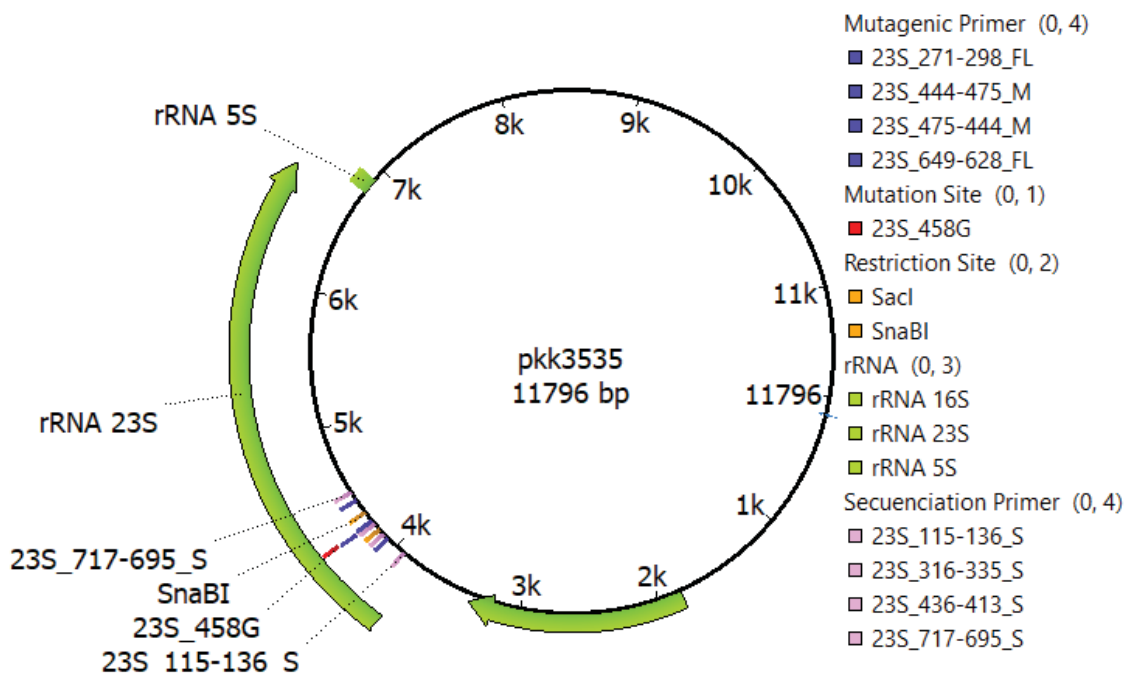


Figura 4. Esquema del plásmido pKK-3535 visto en UGENE. Tal y como indica la leyenda: las flechas verdes marcan la ubicación y tamaño de los genes que codifican para los tres ARNr (16S, 23S y 5S), la marca roja representa la posición de interés 458G, las marcas naranjas marcan la posición de los sitios diana de las enzimas de restricción empleadas (*SacI* y *SnaBI*), las rosas representan los cebadores diseñados para la mutagénesis de sitio-dirigida por PCR y las azules los cebadores diseñados para la secuenciación, todo ello dentro del gen que codifica para el ARNr 23S. El plásmido completo consiste en 11796 pb.

Para la selección de los cebadores, además de determinar con qué partes del fragmento de interés debían hibridar y sus secuencias en UGENE, también es importante calcular sus temperaturas de *melting* y averiguar si pueden hibridar consigo mismos o entre ellos al mezclarlos en el tubo de PCR, lo que se lleva a cabo con la herramienta 'OligoAnalyzer Tool' de la página web <http://eu.idtdna.com>

A continuación, se enumeran los 4 cebadores de calidad HPSF (sintetizados por Isogen Life Science) empleados para la mutagénesis de sitio dirigido (Tabla 2), constando de una pareja de cebadores que flanquean el fragmento de interés (llamados FL) y otros 2 que hibridan con la secuencia concreta en la que se encuentra la posición que pretende mutarse y, de hecho, incluyen las mutaciones (llamados M) (Figura 5).

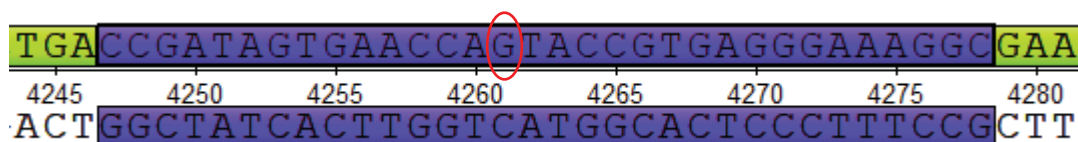


Figura 5. Fragmento de la secuencia del ADN que codifica para el ARNr 23S visto en UGENE. Aparece la posición de interés, la 458G (4261G según la numeración genómica), marcada con un círculo rojo. En azul está marcada la secuencia de los 2 cebadores M empleados en la mutagénesis de sitio-dirigida por PCR.

Tabla 2. Cebadores empleados para la mutagénesis de sitio-dirigida, donde N= A, C, G, T.

Nombre Cebador	Longitud	Secuencia	Temperatura melting (°C)
23S_271-298_FL	28	GAGCCTGAATCAGTGTGTGTGTTAGTGG	60.8
23S_444-475_M	32	CCGATAGTGAACCA N TACCGTGAGGGAAAGGC	64.9
23S_475-444_M	32	GCCTTTCCCTCACGGTA N TGGTTCACATCGG	64.8
23S_649-628_FL	22	CCCAGTTAAGACTCGGTTTCCC	57.4

4.2 Protocolo de la OE-PCR

Los protocolos de PCR se diseñaron de manera empírica para cada pareja de cebadores con el fin de optimizar la cantidad y el tamaño de los fragmentos recombinantes obtenidos, centrando dicha optimización en las concentraciones de las mezclas de reacción y en la programación de los ciclos de temperaturas (Tablas 3 y 4).

A continuación, se especifican los protocolos de temperaturas y los volúmenes de las mezclas de reacción empleadas en cada paso de la OE-PCR, así como las parejas de cebadores que se utilizaron en cada una de ellas. Además, se esquematiza todo el proceso (Figura 6).

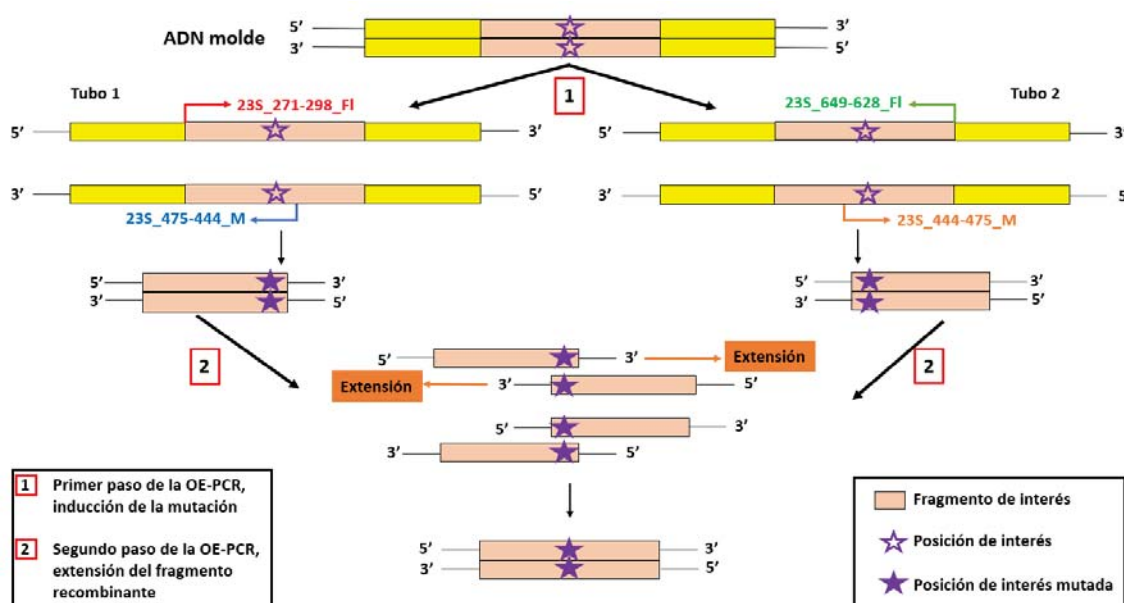


Figura 6. Esquema del proceso de OE-PCR. **1**, Inducción de la mutación en dos fragmentos separados (Tubo 1 y Tubo 2); **2**, Extensión del fragmento recombinante.

4.2.1 OE-PCR: inducción de la mutación

Se inducen las mutaciones en la posición 458G amplificando el fragmento de interés en dos partes llevando a cabo, por tanto, la reacción en dos tubos de manera simultánea y obteniéndose dos fragmentos recombinantes:

- Un tubo en el que se amplifique la mitad anterior del fragmento de interés (Tubo 1): con los cebadores flanqueante 'F' 23S_271-298_FL y el mutagénico 'R' 23S_475-444_M.
- Un tubo en el que se amplifique la mitad posterior del fragmento de interés (Tubo 2): con los cebadores mutagénico 'F' 23S_444-475_M y el flanqueante 'R' 23S_649-628_FL.

Las mezclas de reacción (para un volumen final de 50 μ L) son: 25 μ L de Supreme NzyTaq II 2x Green Master Mix (stock de 0.2 U/ μ L), 1.5 μ L/cebador (stock de 100 μ M) y 2 μ L de ADN plasmídico.

Teniendo en cuenta que la temperatura de *melting* media de cada pareja de cebadores empleados es diferente, se hace un gradiente de temperaturas en el termociclador para encontrar la temperatura óptima de hibridación (Tabla 3).

Tabla 3. Especificaciones de duración y temperatura de las fases para el primer paso de la OE-PCR.

Fases (x30 ciclos)	Duración	Temperatura (°C)
Pre-desnaturalización	3 min.	94
Desnaturalización	30 seg.	94
Hibridación	30 seg.	62.8 (Tubo 1); 61.2 (Tubo 2)
Elongación	1 min.	72
Elongación final	10 min.	72

4.2.2 OE-PCR: extensión del fragmento recombinante

Los productos obtenidos en la PCR anterior se combinan en un único tubo para que éstos actúen al mismo tiempo como molde y como cebadores y conseguir la extensión completa del fragmento recombinante, por tanto, en esta reacción no se añade ninguno de los cebadores sintéticos. Antes de ejecutar esta PCR es necesario purificar las muestras obtenidas en la anterior para eliminar los restos de los cebadores empleados y del Master Mix de la ADN polimerasa, un paso que se explicará en el apartado 5.

Las mezclas de reacción (para un volumen final de 44 μ L) son 25 μ L de Supreme NzyTaq II 2x Green Master Mix (stock de 0.2 U/ μ L) y 2.5 μ L de cada producto de reacción obtenido en la PCR anterior. En este caso, aunque se trabaja con un volumen de 44 μ L se adecúan las concentraciones para un volumen final 50 μ L porque en el mismo tubo se añadirán, posteriormente, los cebadores necesarios para la amplificación del fragmento recombinante, proceso explicado en el apartado 4.3.

A la hora de diseñar el protocolo de temperaturas (Tabla 4) es importante recordar que, como ya se explicó cuando se introdujo esta técnica, la temperatura de la fase de hibridación debe de estar entre 5°C y 10 °C por debajo de la calculada para los cebadores empleados en el primer paso realizado (Bryksin & Matsumura, 2010).

Tabla 4. Especificaciones de duración y temperatura de las fases para el segundo paso de la OE-PCR.

Fases (x30 ciclos)	Duración	Temperatura (°C)
Pre-desnaturalización	3 min.	94
Desnaturalización	30 seg.	94
Hibridación	30 seg.	55
Elongación	1 min.	72
Elongación final	10 min.	72

4.3 Amplificación del fragmento recombinante

Por último, se lleva a cabo una PCR más en la que se amplifica el fragmento recombinante obtenido. En el mismo tubo en el que se extendió el fragmento completo en el paso anterior se añaden 1.5 µL de cada cebador flanqueante (stock de 100 µM): el 'F' 23S_271-298_FL y el 'R' 23S_649-628_FL. El protocolo de temperaturas seguido se encuentra reflejado en la Tabla 5.

Tabla 5. Especificaciones de duración y temperatura de las fases para la amplificación del fragmento recombinante.

Fases (x30 ciclos)	Duración	Temperatura (°C)
Pre-desnaturalización	3 min.	94
Desnaturalización	30 seg.	94
Hibridación	30 seg.	59.1
Elongación	1 min.	72
Elongación final	10 min.	72

5. Purificación de los productos de PCR

Se emplea el *kit* NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini-kit, de Machery-Nagel para la purificación de los productos obtenidos en la primera y última PCR. El proceso de purificación se lleva a cabo para eliminar de la mezcla de reacción los nucleótidos y cebadores, las enzimas, aceites minerales y aditivos empleados en la PCR.

Según la casa comercial, el *kit* empleado purifica de forma eficaz hasta 15 µg de ADN desde 50 pb hasta 20 kpb, rango en el que entra el tamaño de fragmento que esperábamos obtener después de las PCR; también afirma que se puede recuperar entre un 60% y un 90% del ADN de la muestra inicial, algo crucial porque se necesita gran cantidad de material genético para llevar a cabo la posterior secuenciación.

6. Electroforesis en gel de agarosa

Para observar el tamaño de los fragmentos obtenidos en las PCR y confirmar que concuerda con el que se esperaba se realiza una electroforesis en gel de agarosa (Tabla 6).

Tabla 6. Resolución para las moléculas de ADN lineal a diferentes concentraciones de agarosa

Tamaño de fragmento (pb)	Concentración final de agarosa (% p/v)
800 – 10000	0.8
400 – 8000	1
300 – 7000	1.2
200 – 4000	1.5
100 – 2000	2

Se usa como tinte para el gel 'Etb Out Nucleic Acid Staining Solution', y como marcador de peso molecular 100 bp Ladder DNA Marker II, ambos de la casa comercial Yeastern Biotech. Como tampón de carga se emplea TAE 1X (disolución de Tris-Acetato y EDTA). La electroforesis se lleva a cabo con voltaje fijo, a 80 V.

7. Purificación de los fragmentos de interés contenidos en el gel de agarosa

8. Inserción del ADN recombinante en el vector de clonación

8.1 Endonucleasas de restricción empleadas

CCCCCTACACAAAAATGCACATGCTGT **SAGCTC** GATGAGTAGGGCGGGACACGTTGGTATCCTGTCTGAATATGGGGGGACCATCCTCC
 4 137 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 42k 4205 4215 4220 4 224
 GGGGCGATGTGTTTTTACGTGTACGACACTCGAGCTACTCATCCGCCCTGTGCACCATAGGACAGACTTATACCCCCCT **GGTAGGAGG**
 AAGGCTAAATACTCCTGACTGA **CCGATAGTGAACCA** **G** **TACCGTGAGGGAAAGGC** **GAAAAAGAACCCCGGCGAGGGGAGTGAAAAAGAAC**
 4 225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4 3k 4305 4312
TTCCGATTATGAGGACTGACT **GGCTATCACITGGTCATGGCACTCCCTTTCGG**CTTTTCTGGGGCCGCTCCCTCACTTTTTTCTTG
 CTGA AACCGTG **TACGTA**CAAGCAGTGGGAGCACGCTTAGGCGTGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTCTG
 4 313 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4 400
 GACTTTGGGCACATGCATGTTCTGCACCTCTGTCGAAATCCGCACACGTGACGATGGAAACATATTACCCAGTCTGCTGAATATAAGAC

14

- **SacI**. Esta endonucleasa genera extremos cohesivos (Figura 8A), ya que corta en un punto diferente en cada cadena, dejando un corto fragmento de cadena simple. En el caso del plásmido pKK-3535, la secuencia diana de esta enzima se encuentra en las posiciones 361-366 del ARNr 23S (posiciones genómicas: 4164-4169).
- **SnaBI**. Esta endonucleasa genera extremos romos (Figura 8B), ya que corta en el mismo punto en ambas cadenas de ADN. En el caso del plásmido pKK-3535, la secuencia diana de esta enzima se encuentra en las posiciones 521-526 del ARNr 23S (posiciones genómicas: 4324-4329).

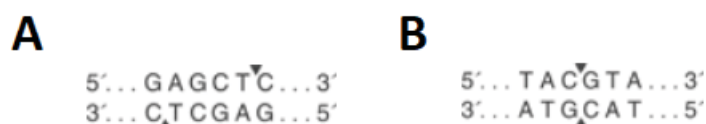


Figura 8. Secuencias diana de las endonucleasas de restricción *SacI* (A) y *SnaBI* (B). Fuente: New England BioLabs Inc.

9. Transformación de la cepa hospedadora y selección de colonias transformadas

Una vez insertado el fragmento de ADN recombinante en el vector de clonación se procede a la transformación de las células hospedadoras: inicialmente se transforman células de la especie *E. coli* cepa MDA6646 que, como se ha explicado, presentan el alelo *pcnB*, el cual permite el mantenimiento de bajos niveles de plásmidos portadores de mutaciones altamente perjudiciales para la célula (Vila-Sanjurjo, y Dahlberg, 2001).

Para comprobar que las bacterias han introducido el plásmido de forma estable, y aprovechando que es portador de un gen de resistencia a Ampicilina, se cultivan en un medio sólido LB con Amp. 200mg/mL: las bacterias que hayan introducido el plásmido crecerán formando colonias aisladas y las que no lo hayan hecho serán inviables, ya que serán sensibles a la Ampicilina.

10. Secuenciación del plásmido contenido en las células transformadas

Tras la transformación de la cepa MDA6646 de *E. coli*, el ADN plasmídico será secuenciado para verificar la identidad de las mutaciones inducidas. Para ello, los cultivos se trasladan al departamento de Biología Molecular del SAI (Servizos de Apoio á Investigación), órgano dependiente de la Universidade da Coruña.

Como en el caso de los cebadores utilizados para la PCR mutagénica, se diseñan otros 4 cebadores para la secuenciación (Tabla 7) empleando el software UGENE y la herramienta '*OligoAnalyzer Tool*' de la página web <http://eu.idtdna.com>, que también fueron sintetizados por la compañía Isogen Life Science con calidad HPSF.

Tabla 7. Cebadores empleados para la secuenciación del fragmento mutagénico

Nombre Cebador	Longitud	Secuencia	Temperatura melting (°C)
23S_115-136_S	22	CCGAATGGGGAAACCCAGTGTG	60.6
23S_436-413_S	24	GGAGTATTTAGCCTTGGAGGATGG	56.9
23S_316-335_S	20	CGCGATACAGGGTGACAGCC	60.6
23S_717-695_S	23	GTTACCCAACCTTCAACCTGCCC	60.4

11. Análisis de crecimiento de las cepas mutantes

Verificada la identidad de las mutaciones inducidas, se procede a transformar la cepa AVS69009 en la que todo el ARNr proviene de plásmidos, permitiendo así la expresión de las mutaciones y la caracterización de sus efectos. Es en esta cepa en la se desarrollarán los análisis de las tasas de crecimiento bacteriano por medio de la medición del tiempo de doblaje de la población en cultivos líquidos (Vila-Sanjurjo, Squires y Dahlberg, 1999).

PLAN DE TRABAJO

El tiempo que se estimó necesario para la realización de este TFG es de 5 meses (de febrero a junio del 2020). A continuación, se detallan las fechas propuestas inicialmente para llevar a cabo todos los procesos anteriormente explicados:

Febrero

1. Selección de la cepa hospedadora: *Escherichia coli*, cepa AVS69009 (delta7) (Vila-Sanjurjo, Squires y Dahlberg, 1999).
2. Diseño de la estrategia de mutación de la posición de interés: OE-PCR.
3. Diseño de la estrategia de clonación del fragmento recombinante: selección del vector de clonación (plásmido pKK-3535).
4. Trabajo bioinformático: familiarización con el *software* UGENE, selección de los cebadores para la OE-PCR y la secuenciación del fragmento obtenido, y selección de las endonucleasas de restricción necesarias para la inserción de dicho fragmento en el vector de clonación.

Marzo

5. Extracción del plásmido pKK-3535, empleado como vector de clonación, a partir de la cepa TG-1 de *Escherichia coli*, proporcionada por el laboratorio de investigación del GIBE, de la Universidade da Coruña.
6. Puesta a punto de las reacciones de PCR que van a llevarse a cabo: comprobación del correcto funcionamiento de los cebadores sintéticos y determinación de las temperaturas óptimas para las reacciones, duración de las fases en función del tamaño de fragmento esperado y número de ciclos.
7. Mutagénesis de sitio-dirigida por PCR.
8. Comprobación del tamaño de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR: electroforesis en gel de Agarosa y purificación de los fragmentos de interés.

Abril

9. Comprobación de la correcta inducción de la mutación en el sitio de interés: secuenciación de los fragmentos obtenidos en las reacciones de PCR. Este proceso es llevado a cabo por el departamento de Biología Molecular del SAI (Servizos de Apoio á Investigación), órgano dependiente de la Universidade da Coruña.

Mayo

10. Digestión con las endonucleasas de restricción y ligación con la ADN ligasa del vector de clonación plasmídico y el fragmento de ADN recombinante obtenido en las reacciones de PCR.
11. Transformación y selección de las células hospedadoras.
12. Observación y análisis de los resultados obtenidos.

Junio

13. Redacción de la presente memoria.

RESULTADOS

Aunque no pudo llevarse a cabo el proyecto de forma íntegra sí se preparó una versión *in silico* del plásmido pKK-3535, se diseñaron los cebadores, se ejecutaron las reacciones de la OE-PCR y la amplificación del fragmento recombinante, y se observaron los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en gel de agarosa antes de que se decretase el Estado de Alarma. Así, aunque no se puede asegurar que las mutaciones en la posición 458G se hayan inducido correctamente porque no fue posible secuenciar los plásmidos obtenidos tras la transformación de la cepa MDA6646 de *E. coli*, al observar las imágenes de los geles obtenidas con el transiluminador sí puede confirmarse que los fragmentos obtenidos son del tamaño esperado, un tamaño que se calculó previamente con el *software* UGENE.

En la primera PCR realizada, el paso de la OE-PCR en el que se inducen las mutaciones, se obtuvieron dos fragmentos (Figura 9):

- En el Tubo 1, en el que se ha amplificado la parte anterior de la secuencia de interés, según UGENE cabría esperar un fragmento de 204 pb, coincidiendo con la migración en el gel del fragmento obtenido hasta los, aproximadamente, 200 pb.
- En el Tubo 2, en el que se ha amplificado la parte posterior de la secuencia de interés, según UGENE cabría esperar un fragmento de 205 pb, coincidiendo, también, con la migración en el gel del fragmento obtenido hasta los, aproximadamente, 200 pb.

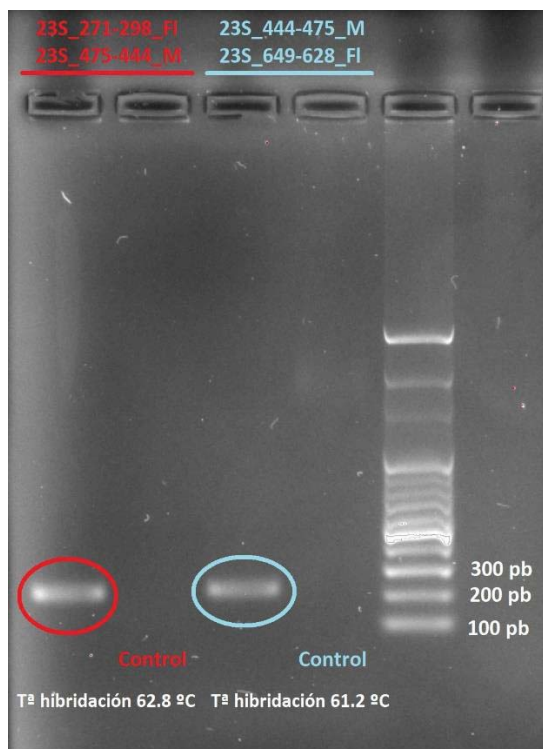


Figura 9. Gel de agarosa al 1% en el que han migrado los fragmentos mutagénicos obtenidos en los dos tubos de reacción del primer paso de la OE-PCR. El fragmento anterior, amplificado con los cebadores 23S_271-298_FL y 23S_475-444_M, aparece marcado con un círculo rojo (tamaño esperado: 204 pb); el fragmento posterior, amplificado con los cebadores 23S_444-475_M y 23S_649-628_FL, aparece marcado con un círculo azul (tamaño esperado: 205 pb). También se indican las temperaturas empleadas en la fase de hibridación de cada tubo (62.8°C y 61.2°C, respectivamente), calculadas como la temperatura media de *melting* de cada pareja de cebadores empleada. El marcador de peso molecular usado en la electroforesis es el 100 bp Ladder DNA Marker II.

En la amplificación del fragmento de interés completo (Figura 10) se esperaba un fragmento de 378 pb, coincidiendo también con el tamaño de fragmento obtenido. Además de la banda correspondiente al fragmento esperado se obtienen otras dos: una de entre 600 y 700 pb, que podría corresponderse con grandes fragmentos amplificados a partir de las cadenas de ADN molde en la primera PCR, y otra de aproximadamente 200 pb, que en este caso podrían ser fragmentos que no se extendieron en el segundo paso de la OE-PCR.

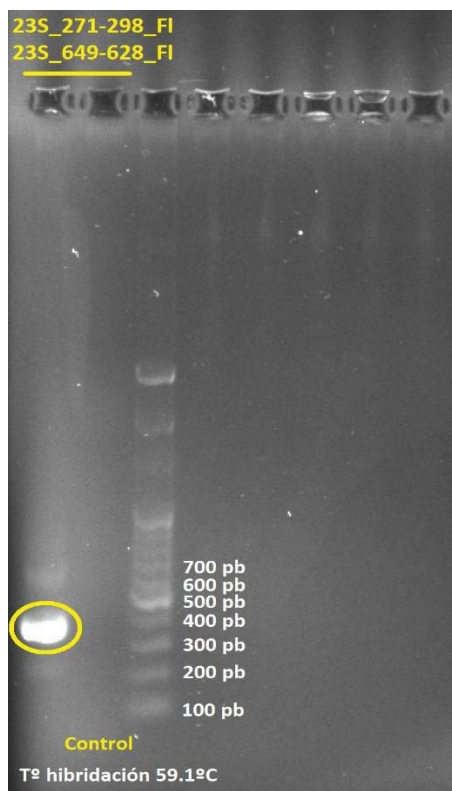


Figura 10. Gel de agarosa al 1% en el que ha migrado el fragmento mutagénico amplificado obtenido de la extensión llevada a cabo en el segundo paso de la OE-PCR. El fragmento de interés, amplificado con los cebadores '23S_271-298_FI' y '23S_649-628_FI', aparece marcado con un círculo amarillo (tamaño esperado: 378 pb). También se indica la temperatura empleada en la fase de hibridación (59.1 °C), calculada como la media de las temperaturas de *melting* de los cebadores empleados. El marcador de peso molecular empleado en la electroforesis es 100 bp Ladder DNA Marker II.

DISCUSIÓN

Si hubiese llegado a completarse el proyecto, una vez transformadas las células de *E. coli* habría que observar su crecimiento para analizar si las mutaciones inducidas afectan de alguna forma, y en qué grado, a la viabilidad celular.

Como ya se ha explicado, la cantidad de ribosomas presentes en una célula es directamente proporcional a su actividad metabólica y, por tanto, a la tasa de crecimiento (Cooper y Hausman, 2014; Madigan, Martinko, Dunlap y Clarck, 2009). Este hecho se ha observado en varios estudios:

- Kjeldgaard y Kurland (1963) analizaron la relación existente en bacterias entre la proporción del ARNr 4S y el ARN total en células con diferentes tasas de crecimiento, encontrando que en aquellas que crecían a una velocidad de 2-4 duplicaciones/hora la proporción variaba alrededor de un 20%, mientras que en las que lo hacían a una velocidad de 0-2 duplicaciones/hora la variación llegaba al 65%. Es decir, la proporción de ARNr 4S respecto al ARN total es mucho mayor en organismos con tasas de crecimiento elevadas.
- Por su parte, Ecker y Schaechter (1963) confirmaron, estudiando cultivos de *Salmonella typhimurium* con diferentes tasas de crecimiento, que la concentración de ribosomas (expresada en su estudio como la relación entre cantidad de ribosomas y proteínas solubles) es una función directa y lineal de la tasa de crecimiento.
- Por último, en estudios concretos llevados a cabo con *E. coli*, se observó que la pérdida excesiva de ribosomas, así como la de factores de iniciación de la traducción, resultaba en una de las principales causas de muerte por pérdida de viabilidad en los cultivos celulares (Davis, Luger y Phang, 1986)

Por tanto, si se hubiese podido analizar el crecimiento celular, cabría esperar que la afectación de la estructura o funcionalidad del ribosoma derivada de la inducción de la mutación provocase el descenso de la síntesis proteica, tal y como observaron Haumann y colaboradores (2020), que se manifestaría como un descenso de la viabilidad celular en los cultivos.

CONCLUSIONES

De la realización íntegra del proyecto, basándonos en la bibliografía publicada hasta el momento, se supone que podría extraerse la siguiente conclusión: cabría esperar que las mutaciones en la posición 458 diesen lugar a fenotipos letales o deletéreos.

BIBLIOGRAFÍA

Bryksin, A. y Matsumura, I. (2010). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*, 48 (6), 463-465. DOI: 10.2144/000113418

Coll, P., Coque, M., Domínguez, M., Vázquez, J. y Vila, J. (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 6-10. Emilia Cercenado y Rafael Cantón.

Cooper, G. y Hausman, R. (2014). *La célula* (6ª ed.), 8-9, 17-18 y 299-305. Madrid: Marbán Libros.

Davis, B., Luger, S. y Phang, T. (1986). Role of ribosome degradation in death of starved *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology* 166 (2), 439-445. DOI: 10.1128/jb.166.2.439-445.1986

Ecker, R. y Schaechter, M. (1963). Ribosome content and the rate of growth of *Salmonella typhimurium*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*, 76, 275-279. DOI: 10.1016/0926-6550(63)90040-9

Elson, J., Smith, P. y Vila-Sanjurjo, A. (2015). Heterologous Inferential Analysis (HIA) as a method to understand the role of mitochondrial rRNA mutations in pathogenesis. *Mitochondrial Medicine*, 1264, 369-383. DOI: 10.1007/978-1-4939-2257-4_32

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), 557-580. DOI: 10.1016/s0022-2836(83)80284-8

Haumann, S., Boix, J., Knuever, J., Bieling, A., Vila Sanjurjo, A., y Elson, J., Blakely, E., Taylor, R., Riet, N., Abken, H., Kashar, H., g-Do, H. y Wiesner, R. (2020). Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial biogenesis and increase the tumorigenic potential of Hodgkin and Reed–Sternberg cells. *Carcinogenesis*. DOI: 10.1093/carcin/bgaa032

Heus, H. y Pardi, A. (1991). Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science*, 253 (5016), 191-194. DOI: 10.1126/science.1712983

Kjeldgaard, N. y Kurland, C. (1963). The distribution of soluble and ribosomal RNA as a function of growth rate. *Journal of Molecular Biology*, 6 (4), 341-348. DOI: 10.1016/S0022-2836(63)80093-5

Lehman, I. (1974). DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science*, 186 (4166), 790-797. DOI: 10.1126/science.186.4166.790

Leontis, N., y Westhof, E. (2003). Analysis of RNA motifs. *Current opinion in Structural Biology*, 13 (3), 300-308. DOI: 10.1016/s0959-440x(03)00076-9

Leontis, N., y Westhof, E. (1998). A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs. *Journal of Molecular Biology*, 283 (3), 571-583. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2106

Lodish, H. (2016). *Biología celular y molecular* (7ª ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

Macbeth, M. y Wool, I. (1999). The phenotype of mutations of G2655 in the sarcin/ricin domain of 23S ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology*, 285 (3), 965-975. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2388

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., y Clarck, D. (2009). *Brock* (12ª ed.), 217-219, 232 y 348-350. Madrid: Pearson Educación.

Mullis, K. (1990). The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262 (4), 56-65. DOI: 10.1038/scientificamerican0490-56

Neufeld, T., Mittelman, A., Buchner, V., y Rishpon, J. (2005). Electrochemical phagemid assay for the specific detection of bacteria using *Escherichia coli* TG-1 and the M13KO7 phagemid in a model system. *Analytical Chemistry*, 77 (2), 652-657. DOI: 10.1021/ac0488053

Nissen, P., Hansen, J., Nenad, B., Moore, P. y Steitz, T. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289 (5481), 920-930. DOI: 10.1126/science.289.5481.920

Noller, N., Hoffarth, V. y Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, 256 (5062), 1416-1419. DOI: 10.1126/science.1604315

Vila-Sanjurjo, A. y Dahlberg, A. (2001). Mutational analysis of the conserved bases C1402 and A1500 in the center of the decoding domain of *Escherichia coli* 16 S rRNA reveals an important tertiary interaction. *Journal of Molecular Biology*, 308 (3), 457-463. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4576

Vila-Sanjurjo, A., Smith, P. y Elson, J. (2020). Heterologous Inferential Analysis (HIA) and other emerging concepts in understanding mitochondrial variation in pathogenesis: there is no more low hanging fruit. *Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, Mitochondrial Medicine*, 2ª ed. Editado por V. Weissig, M. Edeas. Humana Press, Springer New York Heidelberg Dordrecht London.

Vila-Sanjurjo, A., Squires, C. y Dahlberg, A. (1999). Isolation of kasugamycin resistant mutants in the 16 S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 293 (1), 1-8. DOI: 10.1006/jmbi.1999.3160

Yusupov, M. (2001). Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution. *Science*, 292 (5518), 883-896. DOI: 10.1126/science.1060089

Zweib, C., y Dahlberg, A. (1984). Structural and functional analysis of *Escherichia coli* ribosomes containing small deletions around position 1760 in the 23S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 12 (18), 7135-7152. DOI: 10.1093/nar/12.18.7135